مقاله پژوهشی

بررسی و شناسائی ژن های *nuc*، *fen* B *mec*A و *aac(6′)/aph(2″)-Ia* در استافیلوکوکوس اورئوس های ایزوله شده از منطقه شمالغرب ایران با روش Multiplex PCR

مهداد کیانی نیا: گروه گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران
آلکا حسنی: مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران، نویسنده رابط: Email: dr.alkahasani@gmail.com
اکبر حسنی: گروه بیوشیمی و آزمایشگاه های بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
یعقوب شریفی: گروه میکروب شناسی و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
،سینا میرزا احمدی: گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران
لیلا دهقانی: آزمایشگاه میکروب شناسی، بیمارستان سینا، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۹۱/۴/۲۸ پذیرش: ۹۱/۷/۳

چکیده

زمینه و اهداف: استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری شایع پیوژنیک است که دارای قابلیت بالقوه برای کسب مقاومت به آنتی بیوتیکهای جدید می باشد. ظهور مقاومت به آنتی بیوتیکهای رایج مانند آمینوگلیکوزیدها و ونکومایسین به وضعیت موجود یعنی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین(MRSA) افزوده شده است. آمینوگلیکوزیدها از مهمترین عوامل ضد باکتریایی مورد استفاده برای درمان عفونتهای باکتریایی می باشند. هدف مطالعه، توسعه Multiplex-PCR برای تشخیص سریع و دقیق همزمان سویه های استافیلوکوک اورئوس و ژن های مقاومت به آمینوگلیکوزید و متی سیلین می باشد.

مواد و روش ها: ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه های مختلف بالینی با استفاده از روشهای استاندارد باکتری شناسی بدست آمد. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها، با روش دیسک دیفیوژن تست تعیین گردید. استخراج ژنوم DNA با روش SDS-Proteinase K همراه با CTAB صورت گرفت. شناسایی ژنهای *nuc*، *fem*B، *mec*A و *aac(6′)/aph(2″)-Ia* با استفاده از روش Multiplex-PCR انجام شد.

یافته ها: از کل ۱۳۸۹ نمونه بالینی ارسالی به آزمایشگاه، تعداد ۹۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا و تعیین هویت شد. نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی سویه ها، بیانگر بیشترین مقاومت نسبت به پنی سیلین (۹۷/۸ ٪) بود. ژنهای *nuc*، *fem*B و *mec*A بترتیب در ۱۰۰٪ ، ۹۵/۶٪ و ۶۴/۴٪ سویه ها شناسائی گردید. همچنین ۴۸/۹٪ سویه ها حامل ژن *aac(6′)/aph(2″)-Ia* بودند.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که Multiplex PCR نه فقط یک روش مناسب برای تشخیص سریع استافیلوکوک اورئوس می باشد بلکه حضور ژنهای مقاوم به آنتی بیوتیکهای رایج را هم شناسایی می کند.

کلید واژه ها: استافیلوکوکوس اورئوس، آمینوگلیکوزایدها، Multiplex PCR

مقدمه

انتشار سریع و تصاعدی استافیلوکوک های مقاوم به آنتی بیوتیک های مختلف که در ارتباط با مصرف بی رویه آنتی بیوتیک می‌باشد، یک مشکل عمده جهانی را به وجود آورده است (۳-۱). استافیلوکوکوس اورئوس یک کوکسی گرم مثبت است که عامل عفونت های متعددی از جمله اندوکاردیت، عفونت های زخم، سپتی سمی و باکتریمی می باشد و افراد ناقل این باکتری به عنوان منبع مهمی برای ایجاد بیماری در افراد سالم محسوب می‌شوند (۴). با افزایش روز افزون مقاومت به انواع آنتی بیوتیک ها، علی رغم بکارگیری آنتی بیوتیک های قوی و بهبود شرایط بهداشت عمومی و کنترل عفونت های بیمارستانی، هنوز هم استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک پاتوژن مهم در انسان محسوب می شود (۴). معرفی آنتی بیوتیک های جدید علیه عفونت های استافیلوکوکی باعث تغییرات قابل توجهی در روند تکامل باکتریایی شده است، بطوریکه استفاده از داروهای جدید در بیشتر موارد با پیدایش سریع مقاومت استافیلوکوک ها همراه بوده است (۵). در سال ۱۹۵۹ اولین پنی سیلین نیمه صناعی به نام متی سیلین، برای غلبه بر مشکلات ایجاد شده از افزایش تولیدات پنی سیلیناز استافیلوکوک اورئوس مقاوم به پنی سیلین معرفی شد

Archive of SID

www.SID.ir

(۵). در سال ۱۹۸۰ ظهور مقاومت استافیلوکوک اورئوس به متی سیلین (MRSA) موجب نگرانی عمده در سلامت عمومی گردید (۱). مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوک اورئوس به طور اولیه از طریق افزایش تولید پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین به ویژه PBP_{2a} و همچنین PBP تغییر یافته با افینیتی پائین برای آنتی بیوتیک های بتالاکتام ایجاد می شود. ژن *mec*A به عنوان کد کننده PBP_{2a}، برای مقاومت به متی سیلین در استافیلوکوک اورئوس قلمداد شده است (۱). آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی یکی از عوامل مهم باکتریسیدی قابل استفاده برای درمان بسیاری از عفونت های باکتریایی هستند (۶). آمینوگلیکوزیدها به طور معمول شامل یک حلقه آمینوسیکلات مرکزی ۲-داکسی استرپتامین که قندهای آمینی یا در موقعیت ۴ و ۶ مانند جنتامایسین و یا در موقعیت ۴ و ۵ مانند نئومایسین و لیویدومایسین متصل می شود، این مولکول‌های کاتیونی اثرات آنتی بیوتیکی خود را با اتصال به زیر واحد s30 ریبوزومی و در نتیجه قطع ترجمه باکتری اعمال می کنند (۷). فعالیت باکتریسیدی و طیف اثر وسیع آمینوگلیکوزیدها، این داروها را برای درمان عفونت های بیمارستانی بسیار پر اهمیت کرده است (۶). مکانیسم اصلی مقاومت به آمینوگلیکوزیدها غیرفعال‌سازی دارو توسط آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدی است (AMEs). آنزیم AAC(6′)/APH(2″) که به وسیله ژن *aac(6′)/aph(2″)-Ia* کد می شود، موجب مقاومت در میان ایزوله های استافیلوکوکی نسبت به این دسته دارویی می شود و توسط پلاسمید حمل می گردد. آنزیم های دیگری مانند APH(3′)-III و ANT(4′)-I که به ترتیب توسط ژنهای *aph(3′)-IIIa* و *ant(4′)-Ia* رمزگذاری می شوند در گونه های استافیلوکوکی شناسائی شده است (۸ ، ۹). با در نظر گرفتن گسترش سریع مقاومت چند دارویی در بین سویه‌های استاف اورئوس که یک مشکل عمده در سلامت عمومی محسوب می شود و توجه به این که روش های فنوتیپی زمان بر بوده و اغلب خصوصیات فنوتیپی وابسته به شرایط رشد هستند، لزوم بکارگیری روش های مولکولی به واسطه دقت و سرعت بالا برای تشخیص مقاومتهای آنتی بیوتیکی یک امر مهم و ضروری به نظر می رسد (۲،۱۰،۱۱). بر این اساس در این مطالعه، ضمن تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی، اقدام به شناسایی همزمان ژن های *mec*A ،*nuc* ،*fem*B به همراه ژن *aac(6′)/aph(2″)-Ia* با روش Multiplex PCR شد تا راهنمایی مناسب جهت درمان عفونت های MRSA و کنترل عفونت، در مرکز بیماریهای عفونی و گرمسیری بیمارستان سینا صورت گیرد.

مواد و روش ها

جمع آوری و شناسایی نمونه ها: در مطالعه حاضر، تعداد ۱۳۸۹ نمونه بالینی شامل زخم، خون، آبسه، مایعات بدن، لوله تراشه و بینی، از مراکز مختلف آموزشی- درمانی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تبریز، در فاصله زمانی چهار ماهه (از اول آبان ماه تا اول اسفند ماه ۱۳۸۹) به صورت تصادفی جمع آوری شد و در آزمایشگاه مرکز بیماریهای عفونی و گرمسیری بیمارستان سینا، از نظر استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفتند. شناسایی اولیه ایزوله ها با تست هایی فنوتیپی معمول نظیر کشت روی بلاد آگار و مانیتول سالت آگار برای نمونه از بینی (Hi- Media, India)، رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، کواگولاز و DNase انجام شد (۱۲). **تعیین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک ها:** الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی سویه ها، با روش انتشار از دیسک بر روی آگار (Kirby-Bauer) با دیسک های آنتی بیوتیکی MAST (Diagnostics, UK) شامل: پنی سیلین (G 10U)، جنتامایسین (10µg)، اریترومایسین (15µg)، ونکومایسین (30µg)، سیپروفلوکساسین (5µg)، کلیندامایسین (2µg)، ریفامپی سین (5µg)، لینوزولید (30µg)، اگزاسیلین (5µg)، سفوکسی تین (30µg) و سفازولین (30µg) بر روی محیط مولر هینتون آگار (Hi-Media, India) با رعایت استانداردهای Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007) CLSI) تعیین گردید (۱۳). سویه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 به عنوان باکتری مرجع حساس به متی سیلین به منظور کنترل کیفی، صحت و دقت روش مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج DNA: بعد از کشت شبانه باکتری در محیط LB براث (Lauria Bertani) در دمای ۳۷ درجه سیلسیون استخراج DNA به روش SDS-Proteinase K همراه با CTAB انجام شد (۱۵،۱۴).

انجام Multiplex-PCR برای تشخیص ژن های مقاوم:

به منظور انجام Multiplex PCR و حصول اطمینان از وجود ژن‌های مورد مطالعه در سویه ها، ابتدا هر یک از ژن ها به طور انفرادی در دستگاه ترموسایکلر(ASTEC, Japan) تکثیر شدند. سپس روش Multiplex PCR با تغییر در غلظت پرایمرها و $MgCl_2$ برای تکثیر ژن های *nuc* (16)، *fem*B (2)، *mec*A (17) و *aac(6′)/aph(2″)-Ia* (18) بکار گرفته شد. به طور خلاصه، مخلوط لازم جهت واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱/۶ میلی مول $MgCl_2$، ۱ میکرولیتر بافر PCR(10X)، 200 میکرومول dNTPs، ۰/۴ میکرومول از هرجفت پرایمر و در نهایت ۲/۵ واحد پلیمراز Taq تهیه گردید. همه موارد بجز پرایمرها (شرکت Sigma) از شرکت ایرانی سیناژن فراهم شد. مراحل مختلف تکثیر ژن‌های مورد نظر در دستگاه ترموسایکلر شامل: واسرشتگی اولیه ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، بعد از آن ۳۵ چرخه شامل واسرشتگی در ۹۵ °C برای ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۴ °C برای ۳۰ ثانیه، تکثیر۷۲ °C برای ۳۰ ثانیه و تکثیر نهائی در ۷۲ °C برای ۵ دقیقه صورت گرفت. محصولات بدست آمده از PCR با الکتروفورز بر روی ژل ۱٪، رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و در زیر نور التراویوله مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین وزن مولکولی قطعات از نشانگر مولکولی 100bp (GeneRuler™, Fermentas) استفاده شد. داده های بدست آمده از مطالعه با استفاده از روشهای آمار توصیفی (فراوانی- درصد) و با استفاده از نرم افزاری SPSS17 مورد آنالیز قرار گرفت.

یافته ها

از مجموع ۱۳۸۹ نمونه بالینی بررسی شده، تعداد ۹۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس شامل زخم (n=۵۹)، خون (n=۱۱)، آبسه (n=۳)، مایعات بدن (n=۷)، لوله تراشه (n=۶) و بینی (n=۴)

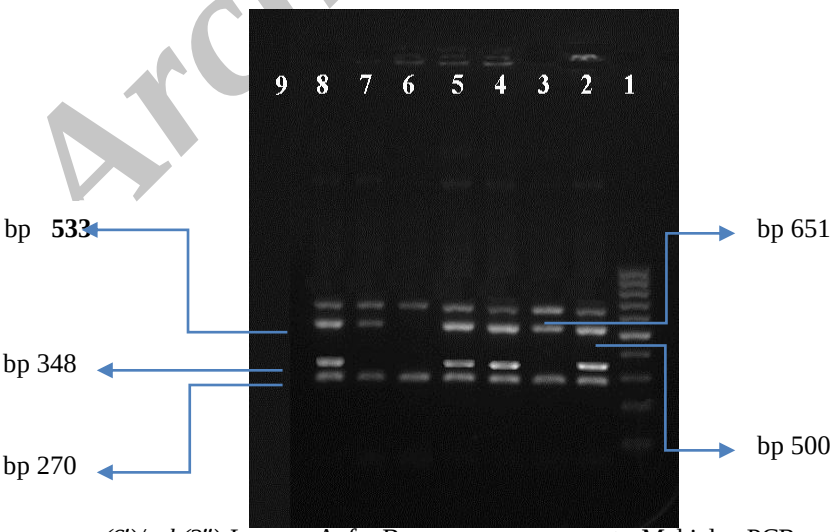
Archive of SID

www.SID.ir

شناسایی گردید. نتایج تست های حساسیت آنتی بیوتیکی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در جدول شماره ۱ آورده شده است. در این مطالعه روش Multiplex-PCR برای تشخیص سریع و همزمان ژن های *nuc*، *femB*، *mecA* و *aac(6′) / aph(2′)-Ia* انجام گردید. هویت همه ۹۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس غربال شده با روش های فنوتیپی با شناسایی ژن *nuc* قطعی شد. ژن مقاومت به متی سیلین (*mecA*$^{+}$) در ۵۸ سویه (۶۴/۴ درصد) شناسایی شد که توزیع آن در سویه های بدست آمده از عفونت های زخم، خون، مایعات بدن، لوله تراشه و بینی به ترتیب ۶۷/۸٪، ۸۱/۸٪، ۴۲/۹٪، ۶۶/۷٪ و ۵۰٪ بود و این نوع مقاومت در سویه های جدا شده از آبسه مشاهد نگردید. ژن *femB* در ۸۶ سویه (۹۵/۶٪) استافیلوکوکوس اورئوس یافت شد که همه سویه های *mecA*$^{+}$ را نیز شامل بودند. ژن عامل مقاومت به جنتامایسین (*aac(6′)/aph(2″)-Ia*) در ۴۴ سویه (۴۸/۹٪) از کل سویه ها مشاهده شد، که از این تعداد، ۳۴ سویه (۷۷/۳٪) از سویه های MRSA و ۱۰سویه (۲۲/۷ ٪) مربوط به سویه های MSSA بود. نتایج ژل الکتروفورز برای ژن های مورد مطالعه در شکل یک نشان داده شده است. حضور ژن *aac(6′)/aph(2″)-Ia* در عفونت های زخم، خون، مایعات بدن، لوله تراشه، آبسه و بینی به ترتیب ۵۲/۵٪، ۴۵/۵٪، ۴۲/۹٪، ۳۳/۳٪ و ۵۰٪ می باشد. مقاومت به متی سیلین با استفاده از روش انتشار آگار از دیسک و روش PCR به ترتیب ۷۲/۲ درصد و ۶۴/۴ درصد به دست آمد. همچنین ۳ سویه در روش های فنوتیپی نسبت به اگزاسیلین حساسیت داشتند ولی دارای ژن *mecA* بودند. در این مطالعه مقاومت به جنتامایسین در کل سویه ۵۳/۹ درصد با روش دیسک دیفیوژن به دست آمد و در روش مولکولی حضور ژن *aac(6′)/aph(2″)-Ia* به میزان ۴۸/۹ درصد بود.

جدول ۱: نتایج آنتی بیوگرام ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مطالعه شده با روش دیسک آگار دیفیوژن

آنتی بیوتیک ها	سویه های جدا شده از بالینی		
	مقاوم	مقاومت بینابینی	حساس
	تعداد (%)	تعداد (٪)	تعداد (%)
پنی سیلین	۸۸ (۹۷/۸)	–	۲ (۲/۲)
جنتامایسین	۴۸ (۵۳/۹)	–	۴۱ (۴۶/۱)
اریترومایسین	۶۲ (۷۱/۱)	–	۲۶ (۲۸/۹)
ونکومایسین	۱۱ (۱۲/۲)	–	۷۹ (۸۷/۸)
سیپروفلوکساسین	۵۸ (۶۴/۴)	۵ (۵/۶)	۲۷ (۳۰)
اگزاسیلین	۶۵ (۷۲/۲)	۳ (۳/۳)	۲۲ (۲۴/۴)
سفوکسی تین	۶۳ (۷۰)	–	۲۷ (۳۰)
کلیندامایسین	۳۸ (۴۲/۲)	–	۵۲ (۵۷/۸)
ریفامپی سین	۱۶ (۱۸/۴)	۳ (۳/۳)	۷۱ (۷۸/۹)
لینوزولید	–	۳ (۳/۳)	۸۷ (۹۶/۷)
سـفازولین	۷ (۷/۸)	–	۸۳ (۹۲/۲)



شکل ۱: Multiplex-PCR برای تشخیص ژن های *nuc*، *femB*، *mecA* و *aac(6′)/aph(2″)-Ia*

ستون ۱: نشانگر وزن bp ۱۰۰ ladder ستون ۲، ۴، ۵، ۸: سویه مثبت به *nuc*، *femB*، *mecA* و *aac(6′)/aph(2″)-Ia*

ستون ۳، ۷: سویه مثبت به *nuc*، *femB*، *mecA* ستون ۶: سویه ATCC 29213 و مثبت به *nuc* و *femB*

ستون ۹: کنترل منفی(فاقد DNA)

طول قطعات تکثیر یافته برای ژن های *nuc*، *femB*، *mecA* و *aac(6′)/aph(2″)-Ia* به ترتیب ۲۷۰، ۶۵۱، ۵۳۳ و ۳۴۸ جفت باز بود.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

اگرچه روش های فنوتیپی به طور معمول برای تشخیص استافیلوکوک های مقاوم به متی سیلین به کار گرفته می شود، ولی تشخیص ژن *mecA* به وسیله آزمایش PCR به عنوان روش استاندارد طلائی مطرح است، به ویژه آزمایش Multiplex-PCR که به طور همزمان چندین ژن را در یک واکنش منفرد به صورت سریع و قابل اطمینان تشخیص می دهد (۱۹–۱۷). در مطالعات متعددی استفاده از تکنیک Multiplex-PCR برای تشخیص ژن های مقاومت به انواع آنتی بیوتیک ها و تشخیص گونه های استافیلوکوک مطرح شده است (۲۰–۲۲). هم سو با این مطالعات، در مطالعه اخیر نیز روش Multiplex-PCR برای تشخیص استافیلوکوک اورئوس و ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک های متی‌سیلین و جنتامایسین بکار گرفته شد (شکل ۱). مطابق مطالعات صورت گرفته بر روی سویه های استافیلوکوک اورئوس، ژن *nuc* یک نوکلئاز مقاوم به حرارت خارج سلولی (thermonuclease TNase) تولید می کند که فراوانی مشابهی با سویه‌های تولید کننده کواگولاز دارد و بعنوان تست آنزیمی (تولید Tnase)در بسیاری از آزمایشگاه های میکروبیولوژی جهت شناسایی سویه های *S.aureus* به کار برده می شود (۲۳)، در مطالعه حاضر نیز سویه هایی تولید کننده کواگولاز، همگی حامل ژن *nuc* بودند. ژن *femB* یک فاکتور ضروری برای مقاومت به متی سیلین را رمزگذاری می کند (۲). در این مطالعه همه سویه های *mecA*$^{+}$ حامل ژن *femB* بودند که تأییدی بر ارتباط این دو ژن است.

مقاومت به متی سیلین در روش انتشار از دیسک و روش PCR به ترتیب ۷۲/۲ درصد و ۶۴/۴ درصد به دست آمد. از بین سویه‌هایی که در روش فنوتیپی انتشار از دیسک نسبت به اگزاسیلین مقاوم بودند، تعداد ۱۲ سویه از لحاظ ژن *mecA* منفی بودند که این اختلاف می تواند ناشی از تولید بیش از حد آنزیم های پنی‌سیلیناز و یا پروتئین های اتصالی دیگری به غیر از PBP_{2a} در سطح سلول باشد که به وسیله ژن هایی غیر از ژن *mecA* کد می شوند و تمایل این پروتئین ها در اتصال به اگزاسیلین کم است (۲۴). همچنین ۳ سویه در روش های فنوتیپی نسبت به اگزاسیلین حساسیت داشتند، ولی حامل ژن *mecA*$^{+}$ بودند. در توجیه این مطلب گفته می شود که در برخی موارد استافیلوکوک ها نسبت به متی سیلین و اگزاسیلین به صورت هتروژن مقاومت نشان می دهد و در این حالت در آزمایش های تعیین حساسیت گاهی به صورت حساس ظاهر می شوند چرا که ژن *mecA* به طور دائم بیان نمی شود در حالی که سویه ها ذاتا حامل این ژن مقاومت هستند (۲۴). جنتامایسین نقش مهمی در درمان عفونت های شدید استافیلوکوکی ایفا می کند و اغلب در ترکیب با یک بتالاکتام و یا یک گلیکوپپتید به ویژه در درمان اندوکاردیت های استافیلوکوکی مورد استفاده قرار می گیرد (۲۰). در این مطالعه، با روش دیسک دیفیوژن، مقاومت به جنتامایسین ۵۳/۹ درصد بر آورد شد درحالیکه با استفاده از ردیابی ژن *aac(6')/aph(2'')-Ia* این میزان ۴۸/۹ درصد بود. این اختلاف می تواند به دلیل حضور سایر ژن های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدی یا مکانیسم های دیگری مانند کاهش نفوذپذیری و یا تغییر اهداف ریبوزومی باشد (۲۵). نظیر مطالعه ما، نتایج مطالعات از کشور ترکیه و کره حاکی از آن است که ژن *aac(6')/aph(2'')-Ia* فراوان ترین (۶۶ ٪ و ۶۵ ٪) ژن کد کننده آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها (AME) در سویه های بالینی است (۲۶ و ۱۰). در مقابل طی تحقیقی در ژاپن در سال ۲۰۰۱، ژن *ant(4')Ia* با فراوانی ۸۴/۵ درصد بیشترین عامل مقاومت به آمینوگلیکوزیدها گزارش شد (۲۷). در مطالعه Choi 2003 و همکاران که با استفاده از PCR Multiplex صورت گرفت از ۴۵ سویه استافیلوکوکوس اورئوس، ۲۵ سویه (۵۵/۶٪) دارای ژن *mecA* و بیشترین شیوع مقاومت به آمینوگلیکوزیدها مربوط به ژن *aac(6')/aph(2'')-Ia* 9/68%) بود (۹). در مطالعه حاضر همانند مطالعه Choi ارتباط معنی داری بین حضور ژن های *mecA* و *aac(6')/aph(2'')-Ia* بدست آمد ($p<۰/۰۵$). در سال ۲۰۰۳ Birgit و همکارانش نشان دادند که Multiplex-PCR یک روش سریع و دقیق برای غربالگری شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در مطالعات اپیدمیولوژیکی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس است، Birgit از این تکنیک برای تشخیص ژن های مقاومت به جنتامایسین و متی‌سیلین استفاده نمود، که از این میان ۹۳ درصد سویه‌ها دارای ژن *mecA* و ۶۳/۳ درصد دارای ژن *aac(6')/aph(2'')-Ia* بودند (۲۸). طی مطالعه ای که در ایران توسط فتح اله زاده و همکاران در سال ۲۰۰۹، بر روی ۱۰۹ ایزوله MRSA انجام شد ژن *aac(6')/aph(2'')-Ia* با فراوانی ۸۳ درصد بیشترین شیوع را در مقایسه با ژن های *aph(3')IIIa* و *ant(4')Ia* داشت (۲۹) که نظیر مطالعه ما، تأییدی بر وجود ارتباط بین این دو ژن است.

نتیجه گیری

با توجه به بروز مقاومت بالا در برابر آنتی بیوتیک های روتین در بین جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، لزوم پایش و بررسی دقیق حساسیت آنتی بیوتیکی در آزمایشگاه امری ضروری است. نتایج تست های فنوتیپی و ژنوتیپی بررسی مقاومت به متی سیلین، ضرورت توام سازی روش های فوق را نشان داد. همچنین مشخص شد که حضور ژن *mecA* در بین سویه های جدا شده از عفونت های خون و مقاومت به ژن *aac(6')/aph(2'')-Ia* در سویه های جدا شده از زخم بیشتر از سایر نمونه های بالینی است. در ضمن ارتباط معنی داری بین حضور همزمان ژن های *mecA* و *aac(6')/aph(2'')* وجود دارد. مطابق مطالعات صورت گرفته، با توجه به زمان‌بر بودن روش های فنوتیپی استفاده از تکنیک Multiplex-PCR برای تشخیص سریع و دقیق ژن های مقاوم به آنتی بیوتیک ها در آزمایشگاه های میکروبیولوژی مفید و ضروری است (۱۹).

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد میکروب شناسی دانشکده علوم پایه و پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان است و هزینه آن توسط مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری بیمارستان سینا در تبریز تامین شده است که می طلبد از زحمات جناب آقای دکتر بهروز نقیلی رئیس مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری بیمارستان سینا تشکر و قدردانی به عمل آید.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Krause K, Renelli M, Difuntorum S, Benton B. In Vitro Activity of Telavancin against Resistant Gram-Positive Bacteria. *Antimicrobial agents and chemo* 2008; **52**(7): 2647–2652.
2. Perez-Roth E, Claverie-Martin F, Villar J, Mendez-Alvarez S. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. *J Clin Microbiol* 2001; **39**(11): 4037-4041.
3. Martinez JL, Baquero F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Anti Ag Chemother* 2000; **44**(7): 1771–1777.
4. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2001; **7**(2): 178-182.
5. Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. *Int J Anti Ag* 2000; **16**(1): 3–10.
6. Edson R, Terrell C. The aminoglycosides. *Mayo.C/in.Proc* 1991; **66**(1): 158-164.
7. Davies JE. *Aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics and their modifying enzymes*. In Antibiotics in Laboratory Medicine 3rd ed. Williams &Wilkins, Baltimore, 1992; PP:.691-713.
8. Hauschild T, Sacha P, Wieczorek P, Zalewska M, Kaczyńska K, Tryniszewska E. Aminoglycosides resistance in clinical isolates of Staphylococcus aureus from a University Hospital in Bialystok, Poland. *Folia Histochem Cyto*. 2008; **46**(2): 225-228.
9. Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH. Multiplex PCR for the Detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among Staphylococcus species. *J Korean Med Sci* 2003; **18**(5): 631-636.
10. Nihonyanagi S, Kanoh Y, Okada K, Uozumi T, Kazuyama Y, Yamaguchi T. Clinical Usefulness of Multiplex PCR Lateral Flow in MRSA Detection: A Novel, Rapid Genetic Testing Method. *Inflammation* 2012; **35**(3): 927-934.
11. Nunes EL, Dos Santos KR, Mondino PJ, Bastos MD, Giambiagide-Marval M. Detection of *ileS*-2 gene encoding mupirocin resistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; **34**(2): 77–78.
12. Forbes BA, Sahm DF. *Weissfeld AS. Bailey&Scotts Dia microbiology*. 12th ed. USA, Elsevier, 2007; PP: 172-213.
13. Wayne, PA. *Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS*. 17th ef. USA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2007. CLSI/NCCLS document M100S17.
14. Mahon L. *Text book of diagnostic microbiology*. 4th ed. Philadelphia, W.B. Saundars Company, 2010; PP: 329-341.
15. Mac Faddin JF. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2nd ed. Baltimore; Williams & Wilkins, 2002; PP: 51.
16. Kuzma K, Malinowski E, Lassa H, Klossowska A. Specific detection of *Staphylococcus aureus* by PCR in intramammary infection. *Bul of the Vet Ins in Pulawy* 2003; **47**(1): 183-190.
17. Nagi A, AL-Haj N, Amghalia E, Mariana N, Shamsudin Rasedee A. Novel Molecular Analysis for Characterization of Staphylococcal Cassette Chromosome in a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Malaysian Hospital. *Res J Bio Sci* 2009; **4**(8): 937-942.
18. Vakulenko SB, Donabedian SM, Voskresenskiy AM, Zervos MJ, Lerner S. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Anti Ag Chemother* 2003; **47**(4): 1423–1426.
19. Amghalia E, Nagi A, Al-Haj N, Mariana N, Son R, Rosli R, etal. Multiplex PCR Assays for the Detection of Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus aureus* Isolated from Malaysian Hospitals. *Res J of Bio Sc* 2009; **4**(4): 444-448.
20. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 1993; **57**(1): 138-163.
21. Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmee M, Wauters G. Specific detection of methicillin-resistant Staphylococcus species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1995; **33**(11): 2864-2867.
22. Martineau F, Picard FJ, Grenier L, Roy PH, Ouellette M, BergeronMG. Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. *J Anti Chemother* 2000; **46**(4): 527-533.
23. Brakstad O. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *J Clin Microbiol* 1992; **30**(7): 1654–1660.
24. Sabath LD. Mechanisms of resistance to beta lactam antibiotics in strains of *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med* 1982; **97**(3): 339-344.
25. Vanhoof R, Godard C, Content J, Nyssen HJ, Hannecart-Pokorni E. Detection by polymerase chain reaction of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*isolates of epidemic phage types. *J of Med Microbiol* 1994; **41**(4): 282–290.
26. Ardic N, Sareyyupoglu B, Ozyurt M, Haznedaroglu T, Ilga U. Investigation of aminoglycoside modifying enzyme genes in methicillin-resistant staphylococci. *Microbiol Res* 2006; **161**(1): 49-54.
27. Ida T, Okamoto R, Shimauchi C, Okubo T, Kuga A, Inoue M. Identification of aminoglycoside modifying enzymes by susceptibility testing: epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. *J Clin Microbiol* 2001; **39**(9): 311-521.
28. Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiology* 2003; **41**(9): 4089-4094.
29. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Feizabadi MM, Sedaghat H, Aligholi M, Taherikalani M. Characterization of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from two hospitals in Tehran, Iran. *Int J Antimicrobial Agents* 2009; **33**(3): 2645.

Archive of SID

www.SID.ir